

Aus der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität
Berlin im Städtischen Krankenhaus Westend
Direktor: Prof.Dr.med., Dr.sc.h.c., Dr.med.vet.h.c.,
Dr.med.h.c. Hans Freiherr v. Kreß

COCARBOXYLASE UND ERYTHROZYTENMEMBRAN

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Lothar Thomas

aus

Oberkaufungen/Kassel

1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550807_0115

Aus der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität
Berlin im Städtischen Krankenhaus Westend
Direktor: Prof.Dr.med., Dr.sc.h.c., Dr.med.vet.h.c.,
Dr.med.h.c. Hans Freiherr v. Kreß

COCARBOXYLASE UND ERYTHROZYTENMEMBRAN

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Lothar Thomas

aus

Oberkaufungen/Kassel

dekan: Professor Dr.med. Hans Heinz N a u m a n n

referent: Priv. Doz.Dr.med. Klaus-Uwe B l u m

Korreferent: Professor Dr.med.Dr.s.c.h.c.Dr.med.vet.h.c.Dr.med.h.c.
Hans Freiherr v. K r e ß

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 14. 2. 1969



Inhaltsübersicht

	Seite
A Einleitung	1
B Kurze Darstellung einiger Stoffwechsel- leistungen menschlicher Erythrozyten	3
C Eigene Untersuchungen und Ergebnisse	
I Beschreibung der angewandten Methoden	8
II Inkubation der Erythrozytensuspensionen von Normal- und Beriberi-Ratten mit Glucose TPP und Thiamin	21
III Inkubation von Erythrozytensuspensionen mit Thiamin und TPP	21
IV Inkubation von Serum mit TPP	29
V Nachweis von freiem Thiamin bei der In- kubation von Erythrozytensuspensionen mit TPP	29
D Diskussion	36
E Zusammenfassung	38
F Literatur	39
G Versuchsprotokoll	44

Anhang

Verzeichnis häufig gebrauchter Abkürzungen

PPW = Pentosephosphatweg

SP = Saure Phosphatase

TPP = Thiaminpyrophosphat

Anstatt der heute üblichen Bezeichnungen für die Coenzyme NAD^+ ; $\text{NADH} + \text{H}^+$; NADP^+ ; $\text{NADPH} + \text{H}^+$ wurden die früheren Bezeichnungen DPN^+ ; $\text{DPNH} + \text{H}^+$; TPN^+ ; $\text{TPNH} + \text{H}^+$ verwendet.

Einleitung

Der therapeutische Effekt der Cocarboxylase (Thiaminpyrophosphat, TPP) zur Behebung echter Vitamin-B₁-Mangelzustände, wie zum Beispiel Beriberi, ist unbestritten und allgemein anerkannt. Darüber wird aber die Gabe von TPP bei vielen anderen Erkrankungen empfohlen, bei denen es zum Teil auf Grund experimenteller Unterlagen eine Wirkung zeigen soll, die über einen reinen Substitutionseffekt hinausgeht. In diesem Falle müßte von einer echten pharmakologischen Wirkung eines Vitamins gesprochen werden.

Es handelt sich unter anderem um eine therapeutische Anwendung von TPP bei Erkrankungen aus dem Gebiet der Inneren Medizin, Gynäkologie, Pädiatrie und Neurologie.

So soll das TPP bei folgenden Herzerkrankungen wirksam sein:

Myokardinfarkte - es stiegen die LDH und die Transaminasen nach TPP-Gabe nicht mehr an (43),

Rhythmusstörungen (5), besonders beim A-V-Block (6)
und der Extrasystolie (5),

Digitalisintoxikationen (5),

Toxischer Diphtherie (30),

Kardialer Dekompensation (4) - die Strophanthinwirkung soll dabei durch TPP-Gabe zu verstärken sein (26, 39).

Alle diese Wirkungen sollen auf einer direkten Einflußnahme des TPP auf das Stoffwechselgeschehen des Organismus beruhen. Die Wirkung wird in den meisten Fällen mit einer Senkung des erhöhten Pyruvatspiegels des kardial dekompensierten Patienten erklärt (4, 6, 29, 43, 51).

In der Behandlung des Diabetes mellitus wird im Koma TPP zur Beseitigung der Acidose zusammen mit Insulin gegeben (18, 19, 33, 48, 49). Eine schnellere Rückkehr zu normalen Blutzucker-

werten wird dabei registriert (2). Insulinresistente Patienten sollen bei gleichzeitiger TPP-Gabe besser auf Insulin ansprechen (28, 49). Eine zusätzliche TPP-Gabe soll beim Diabetiker zu einem verminderten Insulinbedarf führen (13, 47).

Bei kindlichen Toxikosen zeigt das TPP eine gute Wirksamkeit, speziell im Koma dyspepticum (31). Die dabei durch Hyperpyruvämie gekennzeichnete acidotische Stoffwechsellage und das ketonämische Erbrechen sollen durch TPP gut zu beeinflussen sein (16).

Bei multipler Sklerose soll die Verabfolgung von TPP bei frischen Schüben eine gute Wirksamkeit zeigen (21), während in chronischen Fällen nur vereinzelt Besserungen erzielt wurden (20, 32).

MARKEES zeigt, daß fast alle azidotischen Stoffwechselgeschehen mit einer Hyperpyruvämie einhergehen, diese kann dabei als Indikator der jeweiligen Stoffwechsellage gelten (37). Der erhöhte Pyruvatspiegel sinkt nach TPP-Gabe rasch auf den Normalwert ab (29, 43, 51, 54). Es wird daher die Gabe von TPP bei allen Acidosen, die mit einer Hyperpyruvämie einhergehen, empfohlen (29, 37).

Neben den oben erwähnten Indikationen wird das TPP noch zur Behandlung folgender Erkrankungen angewandt:

Neuritiden (3),

Nephropathien (29),

Toxische Grippeinfektionen (29),

Meningitis cerebrospinalis (29),

Scharlach (29),

Typhus abdominalis (29),

Tropenerkrankungen (42),

Bei allen diesen Krankheitsbildern soll das TPP parenteral verabfolgt werden. Berichte über eine orale Wirksamkeit

dieser Verbindung liegen nicht vor.

Das TPP ist eine phosphorylierte Verbindung. Auf Grund ihrer Struktur erscheint es zunächst fraglich, ob diese in der ursprünglich applizierten Form auch eine intrazelluläre Wirkung zeigt, das heißt, ob das TPP überhaupt unverändert die Zellmembran permeiert.

Gewisse Anhaltspunkte ergeben sich aus der Tatsache, daß das TPP bei gesunden Hunden in seiner ursprünglich oral applizierten Form resorbiert wird und im Blut und Urin erscheint (52).

Als Modell für die Frage des Permeationsvermögens des TPP in die Zelle wurde der Erythrozyt gewählt. Er verfügt als reife kernlose Zelle nur über einen verhältnismäßig geringen Erhaltungsstoffwechsel. Dieser ist leicht überschaubar, da ein Teil der biochemischen Vorgänge, die in kernhaltigen Zellen ablaufen, nicht mehr nachweisbar sind (9).

Für die Problemstellung dieser Arbeit ist besonders die Integrität der Zellmembran zu fordern, was sich am Erythrozyten leichter als bei anderen Gewebszellen kontrollieren läßt. Die bei einem Thiaminmangel auftretenden Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel der Zellen sind auch im Erythrozyten biochemisch gut zu erfassen.

Der Kohlenhydratstoffwechsel des Erythrozyten.

Zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels stehen dem Erythrozyten im substratfreien Milieu lediglich endogen gespeicherte Hexose- und Triosephosphate, besonders 2,3 - Diphosphoglycerinsäure und Aminosäuren zur Verfügung (1, 10). Die Entleerung des 2,3 - DPGS - Depots ist nach sechs bis acht Stunden erfolgt (45), es kommt dann zum Abbau struktureigener Substanzen (45). Eine Assimilation von Glucose und damit eine Substratspeicherung in Form von Glykogen findet im Erythrozyten nicht oder nur in geringem Umfang statt (46).

Der Abbau der Glucose kann über folgende Wege gehen:

Der größte Teil der verbrauchten Glucose, etwa 90 %, durchläuft die Reaktion der anaeroben Glykolyse. Es entsteht als Endprodukt durch Reduktion von Brenztraubensäure Milchsäure, die aus den Blutzellen diffundiert (9).

Es kommt hierdurch zu einem Abfall des pH-Wertes um 0,2 - 0,3 Einheiten pro Stunde (15), der durch ein Puffersystem abgefangen werden muß, damit die Glykolyse nicht gehemmt wird (45).

Limitierende Schritte der Glykolyse sind:

1. unter Normalbedingungen die Hexokinasereaktion (53),
2. die Triosephosphatdehydrierung bei einem pH-Wert über 7,3 (46),
3. die Phosphofruktokinase-reaktion bei einem pH-Wert unter 7,1 (46),
4. die DPN - Konzentration (46).

Unter anaeroben Verhältnissen muß das bei der Oxydation zu 1,3 Diphosphoglycerat verbrauchte DPN durch Reduktion des Pyruvats zu Milchsäure ständig regeneriert werden, um den weiteren Ablauf der Glykolyse zu ermöglichen.

Ein zweiter, rein aerober Abbau der Glucose im Erythrozyten erfolgt über den DICKENS-HORECKER-Zyklus (Pentosephosphatweg, PPW). Glucose-6-Phosphat wird von der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase in einem TPN^+ abhängigen Schritt zu 6-Phosphogluconsäure oxydiert, die dann im TPN^+ abhängigen Lactonaseschritt in 3 Ketogluconsäure-6-Phosphat hydrolysiert wird. Letztere decarboxyliert als Ketosäure leicht in Ribulose-5-Phosphat und CO_2 (15).

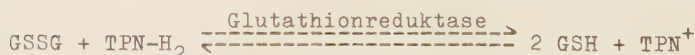
Ribulose-5-Phosphat, das mit dem Ribose-5-Phosphat im Gleichgewicht steht, wird in der TPP abhängigen Transketolasereaktion in ein C_3 und ein C_7 Bruchstück umgewandelt. Diese werden im Transaldolaseschritt in je ein Molekül Fructose-6-Phosphat und Triosephosphat überführt.

Im Transketolase- und Transaldolaseschritt wird Pentose-5-Phosphat immer wieder zu Hexosephosphat regeneriert; auf diese Weise wird in einem zyklischen Prozeß nach sechsmaligem Durchlaufen ein Molekül Glucose zu sechs Molekülen CO_2 oxydiert. Ein Mangel an TPP führt zur Anhäufung von Pentosephosphat und zur verminderten Bildung von CO_2 aus dem C_2 Atom des Glucosephosphates (11).

Die Bedeutung des DICKENS-HORECKER-Zyklus liegt bei den meisten Zellen nicht in der Energiegewinnung, sondern darin, daß er die zur Synthese der Nucleotide und Nucleinsäuren nötigen Pentosen liefert. Eine wichtige Funktion liegt darin, daß der PPW und auch der Citronensäurezyklus der Zelle TPN- H_2 zur Verfügung stellen. Dieses wird von der Zelle besonders zur Synthese von Fettsäuren aus Kohlenhydraten, zur Sterinsynthese und zur Carboxylierung der Brenztraubensäure in Apfelsäure benötigt (34).

Das Glutathion im Stoffwechsel des Erythrozyten.

Eine wichtige Rolle im Stoffwechsel des Erythrozyten spielt das reduzierte Glutathion (GSH). Es wird durch die Glutathionreduktase unter Mitreaktion von TPN- H_2 ständig aus oxydiertem Glutathion (GSSG) gebildet:



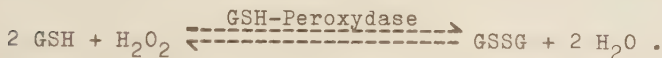
Auch eine Glutathionreduktion unter Mitwirken von DPN- H_2 wurde im menschlichen Erythrozyten beschrieben (8).

Konzentrationsänderungen der intrazellulären Anionen sollen einen Einfluß auf die Beteiligung der jeweiligen Nucleotide bei der Reduktion ausüben. Der Reaktion der TPN- H_2 abhängigen Reduktion kommt jedoch die größere Bedeutung zu (8).

Eine ausreichende Konzentration an GSH ist zur Erhaltung der Erythrozytenstruktur erforderlich (7). Außerdem stellen

die Sulfhydrylgruppen einen wichtigen Schutz für die SH-empfindlichen Enzyme der roten Blutzellen dar. Auch im Rahmen des aktiven Kationentransportes des Erythrozyten scheint dem GSH eine Bedeutung zuzukommen (22).

Durch ein System, an dessen Reaktionen das GSH teilnimmt, wird das Hämoglobin vor einem oxydativen Abbau geschützt. Es handelt sich hierbei um die von der erythrozytenspezifischen GSH-Peroxydase katalysierte Reaktion (40):



Dieser Mechanismus soll einen wirksameren Schutz des Hämoglobins darstellen (41) als die Katalase, die gleichfalls einen oxydativen Abbau des Hämoglobins verhindert (17).

Die Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels des Erythrozyten durch Methylenblau.

Die Dehydrierung organischer Stoffe kann durch den Redoxfarbstoff Methylenblau erfolgen, wenn unter Luftabschluß neben dem Substrat eine Dehydrogenase zugegen ist. Das Methylenblau wird dabei in seine farblose Leukoform überführt. Aerob wirkt Methylenblau als Elektronenüberträger.

Von experimentellem Interesse ist die Möglichkeit, den Sauerstoffverbrauch und damit die Aktivität des PPW der Erythrozyten durch Zugabe von Methylenblau stark zu erhöhen (12). Es läßt sich so ein besserer Einblick in die beteiligten Reaktionen des PPW erzielen. Der roten Blutzelle sollen durch die Aktivierung des oxydativen Abbaues der Glucose über den PPW mehr Pentosephosphate zur Verfügung stehen, die dann wieder zu Hexosen umgewandelt und von neuem verstoffwechselt werden (12). Methylenblau unterdrückt im Erythrozyten anaerob und aerob die Milchsäurebildung (24). Es häuft sich statt-

dessen Brenztraubensäure an (24). So sollen Erythrozytensuspensionen in Gegenwart von Methylenblau nur 40 % der verstoffwechselten Glucose in Milchsäure überführen, während bei Fehlen des Redoxfarbstoffes 90 % der Glucose in Lactat umgesetzt werden (12). Auch bei Abwesenheit von Glucose soll Methylenblau den Sauerstoffverbrauch des Erythrozyten erhöhen. Es wird angenommen, daß dieser Effekt auf einer verstärkten Heranziehung von intrazellulären Phosphatestern beruht (44).

Eigene Untersuchungen.

Um der Problemstellung dieser Arbeit gerecht zu werden, wurden:

- A) in einem biologischen Test die Coenzymwirkung des TPP im Kohlenhydratstoffwechsel des Erythrozyten, speziell im PPW, untersucht, wenn
 1. TPP in das Suspensionsmedium einer Erythrozytensuspension von Normalratten gegeben wird,
 2. TPP in das Suspensionsmedium einer Erythrozytensuspension von Beri-beri Ratten gegeben wird,
 3. anstelle von TPP Thiamin hinzugegeben wird.
- B) in einer weiteren Versuchsanordnung (sog. physikalischer Test)
 1. Erythrozytensuspensionen von Normalpersonen, die
 - a) mit TPP
 - b) mit Thiamin inkubiert wurden, festgestellt, ob nach einer bestimmten Zeit eine Änderung der Konzentration an TPP oder Thiamin im Suspensionsmedium eintritt,
 2. Erythrozytensuspensionen von Normalpersonen mit TPP versetzt und nach einer festgelegten Zeit unter-

sucht, ob im Überstand Thiamin entstanden ist.

3. Serum von Normalpersonen mit TPP inkubiert und ermittelt, ob

a) TPP während der Inkubationszeit aus dem Serum verschwunden ist,

b) durch die Inkubation Thiamin entstanden ist.

Der biologische Test basiert auf folgender Überlegung:
Im DICKENS-HORECKER-Zyklus ist TPP der limitierende Faktor des Transketolaseschrittes. Ein Mangel an TPP muß demzufolge den Pentosephosphatweg blockieren und zu einer meßbaren Anhäufung von Pentosen führen.

Der physikalische Test erfordert genaue Nachweismethoden zur quantitativen Thiamin- und TPP-Bestimmung.

Bestimmungsmethoden für Thiamin

a) fluorometrisch nach:

1. H.N. HAUGEN (21)
2. BURCH, BESSEY, LOVE und LOWRY (13)
3. STROHECKER (50)

b) chromatographisch

1. Papierchromatographie (50)
2. Dünnschichtchromatographie (50)

Bestimmungsmethoden für TPP

a) chemisch nach:

1. B.C.P. JENSEN (27)
2. HENNESSY und CERECEDO (23)
3. STROHECKER (50)

b) enzymatisch nach:

1. WESTENBRINK und STEYN-PARVÉ ()
2. HERBAIN (53)

c) chromatographisch

1. Papierchromatographie (50)
2. Papierelektrophorese (50)

In nachfolgenden Bestimmungen wurde TPP nach der Methode von STROHECKER (50) in Thiamin umgewandelt und dieses quantitativ nach H.N. HAUGEN (21) bestimmt. Thiamin wird dabei im alkalischen Milieu in Thiochrom umgewandelt, das dann fluorometrisch erfaßt wird. Waren TPP und Thiamin nebeneinander zu bestimmen, wurde nach der Methodik von HENNESSY und CERECEDO (23) verfahren.

Angewandte Methoden.

A) Biologischer Test:

1. Erzeugung von Vit.-B₁-Mangelzuständen bei Ratten.

Etwa 250 g schweren weiblichen Wistar-Ratten wurde neben der normalen Kost täglich 1,0 mg Neopyrithiamin in 1,0 ml Wasser gelöst, pro 100 g Körpergewicht mit einer Magensonde verabreicht. Nach durchschnittlich 11 - 13 Tagen traten bei den Tieren Dreh- und Streckkrämpfe als Zeichen des Thiaminmangels auf. In diesem Zustand wurden 300 IE Liquemin in die Schwanzvene injiziert und dann 6 - 8 ml Blut durch Herzpunktion gewonnen.

2. Herstellung der Erythrozytensuspensionen.

Durch dreimaliges Waschen in isotonischer Natriumchloridlösung wurden Plasma, Leukozyten und Thrombozyten weitgehend entfernt und der so gewonnene Erythrozytenbrei in isotonischem Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer (KRP-P) von pH 7,4 resuspendiert.

3. Herstellung der Ansätze.

a) mit Erythrozytensuspensionen von Normaltieren

Inkubationszeit (Min.)	Ansatz
0	A, C
180	B, D

b) mit Erythrozytensuspensionen von Beriberi - Tieren

Inkubationszeit (Min.)	Ansatz
0	A, B
180	E, F

Alle Ansätze außer D enthalten 100 mg % Glucose als Ausgangskonzentration, E und F zusätzlich noch TPP bzw. Thiamin. Jede Untersuchung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.

Testansätze:

A) 1,00 ml ES	C) 1,00 ml ES
0,60 ml KRP-P.	0,70 ml KRP-P.
<u>0,10 ml Glucoselösung</u>	-----
1,70 ml im Reaktionsraum	1,70 ml im Reaktionsraum
B) 1,00 ml ES	D) 1,00 ml ES
0,50 ml KRP-P.	0,60 ml KRP.-P.
0,10 ml Glucoselösung	
<u>0,10 ml Me.Bl.O,1% im S.A.*</u>	<u>0,10 ml Me.Bl.O,1% im S.A.</u>
1,70 ml im Reaktionsraum	1,70 ml im Reaktionsraum
0,20 ml KOH 15% im Z.G.**	0,20 ml KOH 15% im Z.G.
E) 1,00 ml ES	F) 1,00 ml ES
0,40 ml KRP-P.	0,40 ml KRP-P.
0,10 ml Glucoselösung	0,10 ml Glucoselösung
0,10 ml TPP in KRP-P.	0,10 ml Thiamin in KRP-P.
<u>0,10 ml Me.Bl.O,1% im S.A.</u>	<u>0,10 ml Me.Bl.O,1% im S.A.</u>
1,70 ml im Reaktionsraum	1,70 ml im Reaktionsraum
0,20 ml im Z.G.	0,20 ml im Z.G.

* im S.A. = im Seitenarm

**im Z.G. = im Zentralgefäß

Die Inkubation der Testansätze B, D, E, F wurde in der Warburg-Apparatur der Fa. R-aun, Melsungen, durchgeführt. Versuchstemperatur 37°C , kegelförmige Reaktionsgefäße mit Einsatz im Hauptraum und einer Birne mit drehbarem Schliffventil, Gefäßvolumen ca. 12 ml, Schüttelfrequenz ca. 170 pro Minute, Gasphase Luft

Nach einem Vorlauf von 10 Minuten erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe der Methylenblaulösung aus dem Seitenarm. Nach 180 Minuten wurde der Inhalt der Reaktionsgefäße gefällt. Die 0 Minuten Testansätze wurden sofort gefällt.

4. Bestimmung der Konzentrationen von Intermediärprodukten des Kohlenhydratstoffwechsels.

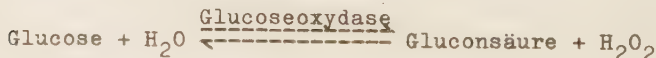
a) Eiweißfällung

Die Eiweißfällung der zu analysierenden Proben erfolgte im Eisbad bei 0°C durch Zugabe von Perchlorsäure in einer Endkonzentration von 5%. Nach Zentrifugieren wurden die Intermediärprodukte in dem Dekantat bestimmt.

b) Glucose

enzymatisch mit Hilfe der Glucoseoxydasereaktion. Die Glucose wird durch die Glucoseoxydase (GOD) zu Gluconsäure und H_2O_2 oxydiert. H_2O_2 oxydiert in enzymatischer Katalyse durch die Peroxydase (POD) den Wasserstoffdonator O-Dianisidin (DH_2), der dabei in einen braunen Farbstoff übergeht. Die Farbintensität ist ein Maß für die umgesetzte Glucosemenge.

Reaktionsschema:



Beispiel eines Testansatzes:

0,2 ml Perchlorsäurefiltrat (neutralisiert)

5,0 ml Glucosereagenz-----

5,2 ml Gesamtvolumen

Schichtdicke 10 mm

Wellenlänge 436 nm

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe des Perchlorsäurefiltrates. Anschließendes Stehenlassen bei Zimmertemperatur. Gemessen wurde die Extinktionsänderung gegenüber dem Reagenzien-Leerwert.

c) Pentose

chemisch nach MEJBAUM (38). Durch Erhitzen mit HCl werden Pentosen in Furfurol überführt. Als Farbreaktion wurde die grüne BIAL'sche Reaktion angewandt, die auftritt, wenn ein Pentosederivat mit Orcin und FeCl_3 -haltiger Salzsäure erhitzt wird.

Beispiel eines Testansatzes:

0,50 ml Perchlorsäurefiltrat

9,50 ml HCl 11,2%

3,00 ml Orcinreagenz*-----

13,00 ml Gesamtvolumen

Schichtdicke 10 mm

Wellenlänge 691 nm

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe des Perchlorsäurefiltrates. Anschließendes Erhitzen auf 100°C für 30 Minuten. Gemessen wurde die Extinktionsänderung gegenüber dem Reagenzien-Leerwert.

* Herstellung des Orcinreagenzes:

0,1 g FeCl_3 ad 100 ml HCl 32%

1,0 g Orcin ad 100 ml FeCl_3 -Lösung

d) Milchsäure

enzymatisch mit Hilfe der Lactatdehydrogenase (25).

Prinzip:

Lactat-Dehydrogenase (LDH) katalysiert die Reaktion



Das Gleichgewicht der Reaktion liegt weit auf der Seite von Lactat und DPN. Es kann jedoch durch DPN-Überschuß, alkalisches Milieu und Abfangen des während der Reaktion gebildeten Pyruvates durch Hydrazin völlig auf die Seite von Pyruvat und DPNH verschoben werden. Lactat wird unter solchen Bedingungen quantitativ in Pyruvat überführt, wobei in stöchiometrischem Verhältnis DPN hydriert wird. Das entstandene DPNH dient in dem kombinierten optischen Test als Meßgröße.

Beispiel eines Testansatzes:

2,00 ml Glycin-Puffer*

0,10 ml Lactatlösung

0,03 ml LDH (2 mg / ml)

0,20 ml DPN 0,027 m

2,33 ml Gesamtvolumen

Schichtdicke 10 mm

Wellenlänge 366 nm

Die Reaktion wurde durch Zugabe von DPN gestartet und der Ansatz 60 Minuten im Wasserbad bei 25° C inkubiert.

*Herstellung des Glycinpuffers:

3,75 g Glycocol1 ad 50,0 ml H₂O

8,0 ml Hydrazin ad 50,0 ml H₂O;

beide Lösungen werden gemischt.

Physikalischer Test.

1. Herstellen der Erythrozytensuspensionen

Gesunden Personen wurde durch Venenpunktion Blut entnommen und mit Heparin ungerinnbar gemacht. Nach zweimaligem Waschen mit isotonischer Kochsalzlösung wurden Plasma, Leukozyten und Thrombozyten weitgehend entfernt und der so gewonnene Erythrozytenbrei in Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer* resuspendiert.

2. Inkubation von Erythrozytensuspensionen mit Thiamin und TPP

Erythrozytensuspensionen wurden mit einer definierten Menge Thiamin bzw. TPP versetzt, so daß die Konzentrationen im Suspensionsmedium zu Beginn der Oxydation etwa

a) $5,0 \times 10^{-6}$ molar

b) $5,0 \times 10^{-5}$ molar

c) $1,0 \times 10^{-4}$ molar an Thiamin bzw. TPP war.

Durch Zusatz einer Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung* wurde der pH-Wert während der Inkubation ständig auf 7,4 gehalten.

* Herstellen des Krebs-Ringer-Phosphat-Puffers:

17,80 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

20,0 ml HCl 1n -----

in 1000 ml Aqua bidest. gelöst

10,0 ml des auf pH 7,4 eingestellten 0,1 molaren Phosphatpuffers ad 100,0 ml Ringerlösung.

Beispiel eines Testansatzes:

20,0 ml Erythrozytensusp. 50%

5,0 ml TPP in KRP-Puffer

1,0 ml Glucoselösung 4%

26,0 ml Gesamtvolumen

Versuchstemperatur 37° C

Schüttelfrequenz 170 pro Minute

kegelförmige Reaktionsgefäße mit Schliff

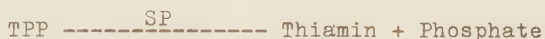
Gefäßvolumen 25 ml

Zur Durchführung von Doppelbestimmungen wurden je 13,0 ml Testansatz getrennt inkubiert.

Zum Zeitpunkt 0-, 30-, 60-, 90 Minuten wurden je 3,0 ml Erythrozytensuspension entnommen, zentrifugiert und in 1,0 ml Überstand quantitativ Thiamin bzw. TPP bestimmt.

3. Umwandlung des TPP in Thiamin.

enzymatisch mit Hilfe der "Sauren Phosphatasereaktion" (SPR) bei einem pH-Wert von 4,5 - 5,0 nach folgendem Reaktionsschema:



Beispiel eines Testansatzes:

1,0 ml Überstand

8,0 ml Aqua bidest.

1,0 ml Perchlorsäure 3%ig

2,0 ml Monojodessigsäure 0,02%ig

1,0 ml Diastaselösung*

15,0 ml Gesamtvolumen

* Herstellen der Diastaselösung:

Diastase (MERCK), Maltosespaltungsvermögen
1 : 250, wurde 3 Stunden vor Versuchsbeginn
mit Aqua bidest. (0,5 g in 3,0 ml) versetzt,
kräftig geschüttelt und 2 Stunden stehen ge-
lassen. Die festen Diastasebestandteile wurden
danach abfiltriert und das Dekantat zum Ansatz
verwendet.

Anhand von Eichkurven wurde festgestellt, daß
bei 12-stündiger Inkubationszeit die Phosphatase-
aktivität höher war, wenn man 0,5 g anstatt 1,0 g
Diastase pro Testansatz verwandte.

Die Saure-Phosphatase-Aktivität der Diastase
betrug bei einem pH von 5 16 mU pro mg, bei
pH 4 14 mU pro mg.

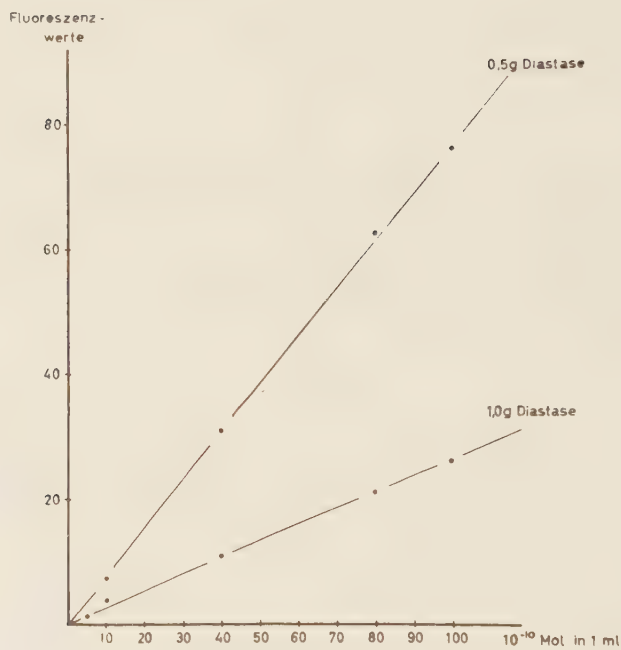


Abb. 2: Spaltung von TPP in Thiamin in
Abhängigkeit von der Diastasemenge
im Testansatz.

Durch die Zugabe von 1,0 ml Perchlorsäure (Endkonzentration 3%) ist die Endkonzentration des Testansatzes 0,2% an Perchlorsäure, der pH-Wert 4,5. Die Diastase-eiweiße fallen dabei während der 12-stündigen Bebrütung ohne Aktivitätsverlust der sauren Phosphatase aus. Die Ansätze sind nach der Entnahme aus dem Brutschrank klar und können sofort zur Thiaminbestimmung verwandt werden. Trübe Ansätze stören die Oxydation des Thiamins zu Thiochrom.

Bestimmung von Thiamin

nach der Thiochrommethode, modifiziert nach H.N. HAUGEN. Thiamin wird dabei zu Thiochrom oxydiert, in Isobutanol extrahiert und quantitativ fluorometrisch bestimmt.

Beispiel eines Oxydationsansatzes:

5,2 ml Oxydationslösung*

10,0 ml Thiaminlösung---

15,2 ml Gesamtvolumen

Oxydationszeit 75 Sek.

Die Oxydation wurde durch Zugabe von 0,1 ml 10%igem Perhydrol gestoppt, das Thiochrom sofort in 10,0 ml Isobutanol ausgeschüttelt und die Isobutanolphase zur fluorometrischen Bestimmung herangezogen.

Messung im Photometer Eppendorf mit Fluoreszenzaufsatz in Quarzküvetten

Schichtdicke 10 mm

Primärfilter 313 + 336 nm Fluorometrie

Sekundärfilter 420 - 3000 nm

*Herstellen der Oxydationslösung:

5,0 ml Natronlauge 40%

0,2 ml Kaliumferricyanidlösung 1%

4. Bestimmung von Thiamin und TPP der mit TPP inkubierten Seren.

Serum, 1 : 2 mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt, wurde mit einer definierten Menge TPP versetzt, im Wasserbad 90 Minuten inkubiert und zum Zeitpunkt 0 und 90 Minuten in 1,0 ml jeweils Thiamin und TPP bestimmt.

Beispiel eines Testansatzes:

10,0 ml Serum (1 : 2 verd.)

2,5 ml TPP-Lösung

1,5 ml KRP-Puffer-----

14,0 ml Gesamtvolumen

Schüttelfrequenz 170 pro Minute

Versuchstemperatur 37° C

Je 1,0 ml Serum wurde ad 30,0 ml Aqua bidest. gegeben, auf 90° C erhitzt, 0,50 ml HCl 25%ig zugesetzt und unter Rühren 12,0 g Na₂SO₄ hinzugefügt. Das Eiweiß wurde abfiltriert und das saure Filtrat mit 1 n NaOH auf den pH-Wert von 7 gebracht. Je 10,0 ml Filtrat wurden zur TPP- und Thiaminbestimmung verwandt.

5. Bestimmung von TPP und Thiamin, wenn beide nebeneinander vorliegen.

Bei gleichzeitigem Vorhandensein von TPP und Thiamin im Überstand wurden zwei Proben entnommen.

In Probe A wurden Thiamin zu Thiochrom und TPP zu Thiochrompyrophosphat oxydiert. Die Thiochrome ließen sich in Isobutanol extrahieren und fluorometrisch bestimmen, während die Thiochrompyrophosphate in der wässrigen Phase zurückblieben.

In Probe B wurden TPP und Thiamin enzymatisch mit Hilfe der Diastase zu freiem Thiamin hydrolysiert und die Gesamtthiamine mit der Thiochrommethode bestimmt.

Die Konzentration an TPP ergab sich aus der Differenz Gesamtthiamin in Probe B, zu freiem Thiamin in Probe A.

Ergebnisse.

A) Biologischer Test

Inkubation der Erythrozytensuspensionen von Normal- und Beriberi-Ratten mit Glucose, TPP und Thiamin.

Wie aus Tab. 1 ersichtlich ist, wird bei einer Inkubation der Erythrozytensuspensionen von Normalratten etwa 50% der zugesetzten Glucose zu Lactat und 20% zu Pentosen umgesetzt. Die "in vitro" - Gabe von Thiamin bewirkt keine Änderung. Bei Thiaminmangelratten kommt es bei vermindertem Glucoseverbrauch zu einer Anhäufung von Pentosen, bei gleichbleibender Lactatbildung. Die Pentoseanhäufung nimmt bei dem Zusatz von TPP und Thiamin jeweils signifikant ab ($t=3,6$; $p\ 0,05$ für Thiamin, resp. $t=3,9$; $p\ 0,02$ für TPP); der Glucoseverbrauch steigt wieder an.

In diesem Test sind keine Unterschiede zwischen der Wirkung des TPP und des Thiamins auf die Restitution des Transketolaseschrittes im PPW nachzuweisen. Es läßt sich ersehen, daß das Thiamin nach seiner Permeation in die rote Blutzelle die Aktivität der Transketolase wieder herstellt. Offensichtlich kann auch das TPP in die Zelle permeieren und dort als Coenzym der Transketolase eine Funktion im Intermediärstoffwechsel in der gleichen Art erfüllen, wie es für das Thiamin zutrifft.

Ob das TPP unverändert die Erythrozytenmembran passiert oder ob vor oder während der Permeation eine Abspaltung von Thiamin erfolgt, das dann intrazellulär wieder zu TPP phosphoryliert wird, kann aus diesen Untersuchungen nicht abgeleitet werden. In weiteren Untersuchungen wurde dieser Frage nachgegangen.

B) Physikalischer Test

Inkubation von Erythrozytensuspensionen mit Thiamin und TPP.

Werden Erythrozytensuspensionen "in vitro" mit verschiedenen Konzentrationen von Thiamin inkubiert und wird die

Aufnahme des Thiamins in die Zellen über einen Zeitraum von 90 Min. verfolgt, ergeben sich die in Abb. 3 - 5 dargestellten Kurven.

Bei der Inkubation von Erythrozytensuspensionen mit TP unter den gleichen Versuchsbedingungen ergeben sich die in Abb. 6 - 8 gezeigten Kurven.

		Glucoseverbrauch			Milchsäurebildung		Pentosebildung		
		N	Mol	Mol	%	S	Mol	%	S
Normal-Tiere	7		179	175	52,9	$\pm 4,5$	36	19,8	$\pm 2,$
Normal-Tiere + Thiamin	7		177	176	54,6	$\pm 5,9$	36	20,2	$\pm 1,$
Beriberi-Tiere	5		148	162	54,8	$\pm 7,8$	56	37,9	$\pm 3,$
Beriberi-Tiere + Thiamin	5		183	183	50,5	$\pm 8,5$	42	23,3	$\pm 4,$
Beriberi-Tiere + Thiamin- pyrophos- phat	5		168	191	57,5	$\pm 5,4$	42	25,5	$\pm 5,$

Angaben in 10^{-8} Mol pro ml einer 25%igen Erythrozytensuspension

Tabelle 1

10^{-11} Mol
proml. Überstand

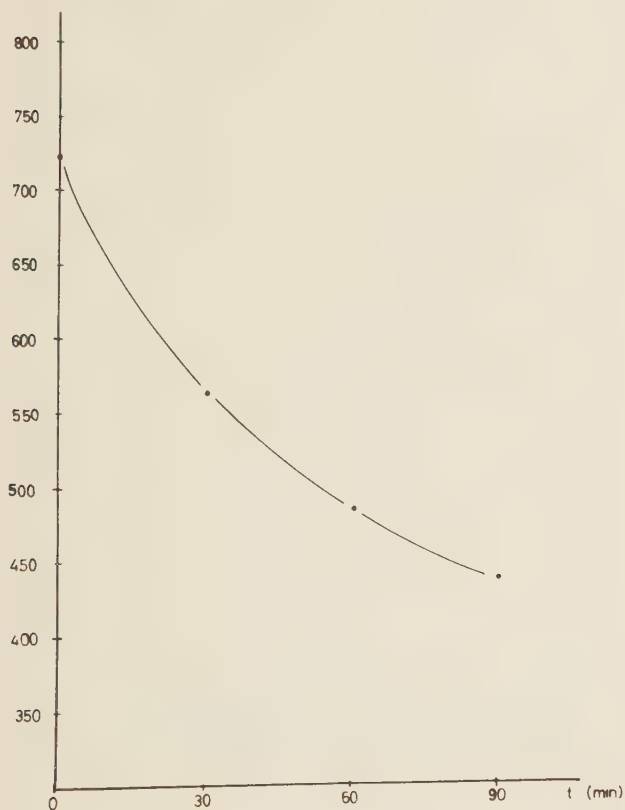


Abb. 3: Abnahme der Thiaminkonzentration
im Suspensionsmedium, bezogen auf
eine 25%ige Erythrozytensuspension
(Ausgangskonzentration $7,3 \times 10^{-6}$ molar).

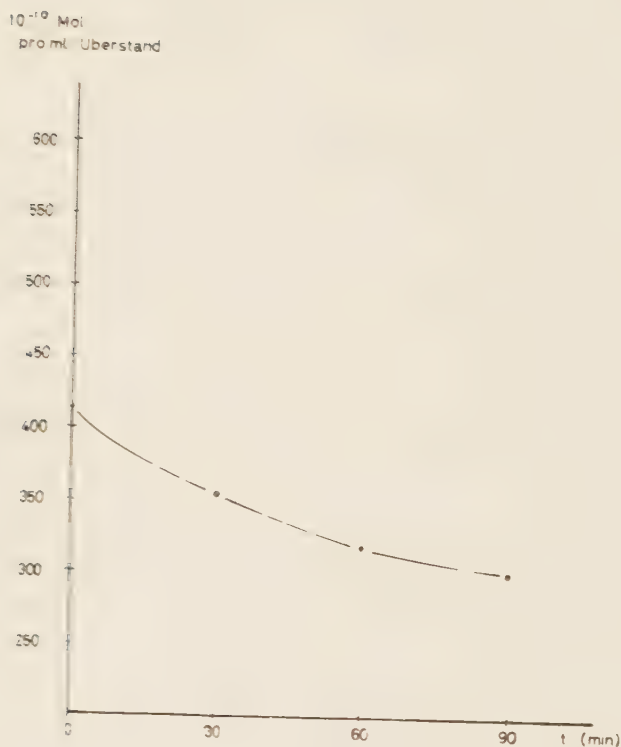


Abb. 4: Abnahme der Thiaminkonzentration
im Suspensionsmedium, bezogen auf
eine 25%ige Erythrozytensuspension
(Ausgangskonzentration $4,2 \times 10^{-5}$ molar).

10^{-10} Mol
pro ml Überstand

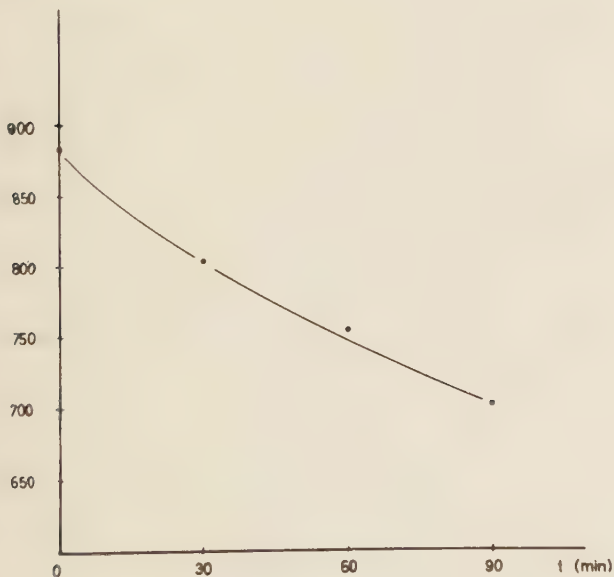


Abb. 5: Abnahme der Thiaminkonzentration
im Suspensionsmedium, bezogen auf
eine 25%ige Erythrozytensuspension
(Ausgangskonzentration $8,7 \times 10^{-5}$ molar).

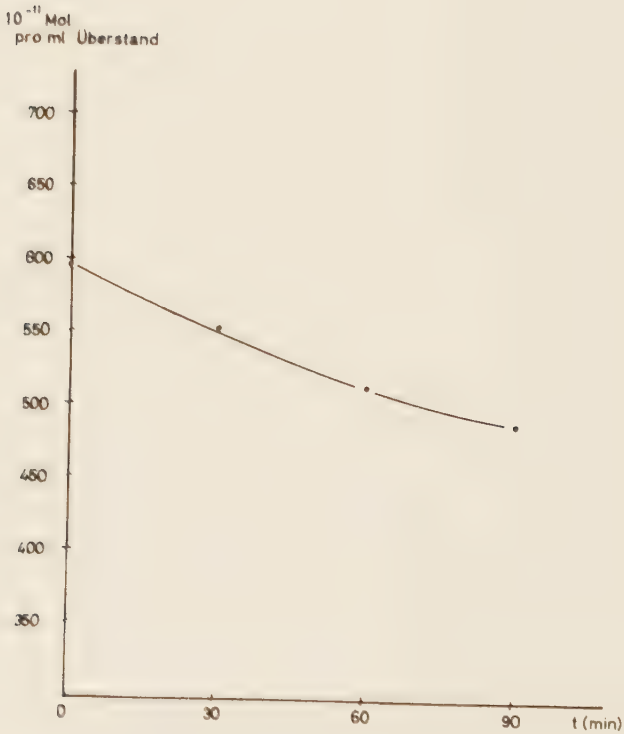


Abb. 6: Abnahme der Cocarboxylasekonzentration im Suspensionsmedium, bezogen auf eine 25%ige Erythrozytensuspension (Ausgangskonzentration $6,0 \times 10^{-6}$ mclar).

10^{-10} Mol
pro ml Überstand

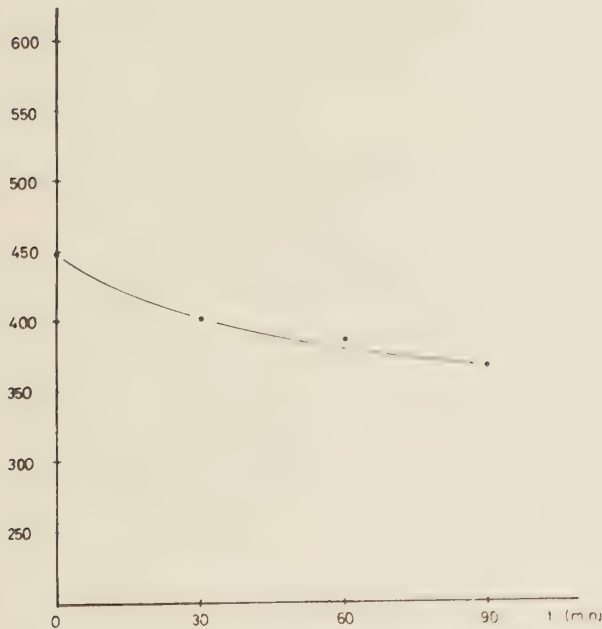


Abb. 7: Abnahme der Cocarboxylasekonzentration
im Suspensionsmedium, bezogen auf eine
25%ige Erythrozytensuspension
(Ausgangskonzentration $4,5 \times 10^{-5}$ molar).

10^{-10} Mol
pro ml Überstand

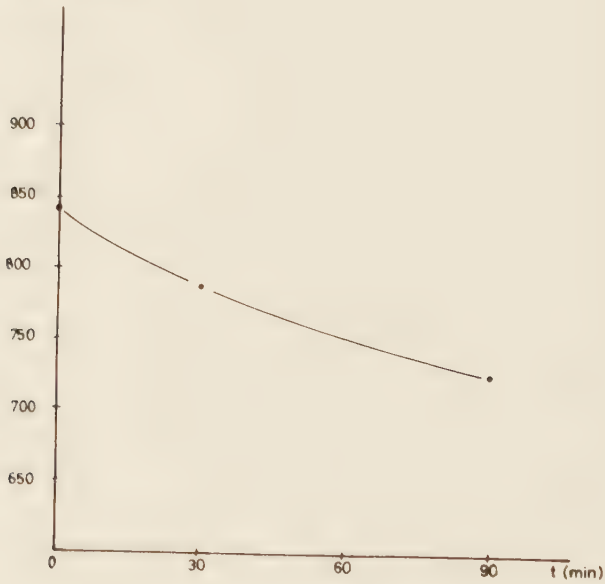


Abb. 8: Abnahme der Cocarboxylasekonzentration
im Suspensionsmedium, bezogen auf eine
25%ige Erythrozytensuspension
(Ausgangskonzentration $8,4 \times 10^{-4}$ molar).

Bei der Thiaminpermeation und auch bei der TPP-Permeation fällt auf, daß mit steigender Inkubationszeit der entsprechenden Verbindung die Permeationsgeschwindigkeit abnimmt. Diese Unterschiede in der Permeationsgeschwindigkeit sind beim Thiamin stärker als beim TPP. Die Kurven beider Permeationen verlaufen nach 90 Min. Inkubationszeit fast asymptotisch.

Werden die Abnahmen der Thiamin- und TPP Konzentrationen im Suspensionsmedium jeweils in einem Schaubild dargestellt, so ist ersichtlich, daß mit steigender Konzentration an Thiamin die Permeationsgeschwindigkeit dieser Verbindung abnimmt (Abb. 9).

Die Permeationsgeschwindigkeit des TPP zeigt demgegenüber keine Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration (Abb. 10).

Die Abb. 11 zeigt die aufgenommene Menge an Inkubationssubstrat nach 90 Min. in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration. Es ist ersichtlich, daß innerhalb eines gleichen Zeitraumes das TPP in einem geringeren Maße von den Zellen aufgenommen wird als das Thiamin.

Eine Auswertung der in Abb. 11 gegebenen Kurven nach LINEWEAVER and BURK (36) legt die Vermutung auf einen kompetitiven Mechanismus nahe (Abb. 12).

Inkubation von Serum mit TPP

Bei der Permeation des TPP durch die Zellmembran können noch andere Faktoren eine Rolle spielen. Es ist daran zu denken, daß das TPP durch das Plasma in Thiamin und Pyrophosphat gespalten wird. Das freie Thiamin passiert dann die Erythrozytenmembran und wird anschließend intrazellulär zu TPP phosphoryliert.

Wird menschliches Serum mit TPP inkubiert und bei 0- und 90 Minuten die Konzentration an TPP und Thiamin bestimmt, so tritt keine Abnahme von TPP ein. Es kann auch kein freies Thiamin nachgewiesen werden (Tab. 2).

Nachweis von freiem Thiamin bei der Inkubation von Erythrozytensuspensionen mit TPP.

Ein Einwirken der roten Blutzelle auf das TPP wäre auch in der Weise denkbar, daß das TPP an der Oberfläche des Erythrozyten in Thiamin und Pyrophosphat gespalten wird. In diesem Falle müßte im Überstand freies Thiamin nachweisbar sein. Tab. 3 zeigt, daß das nicht der Fall ist.

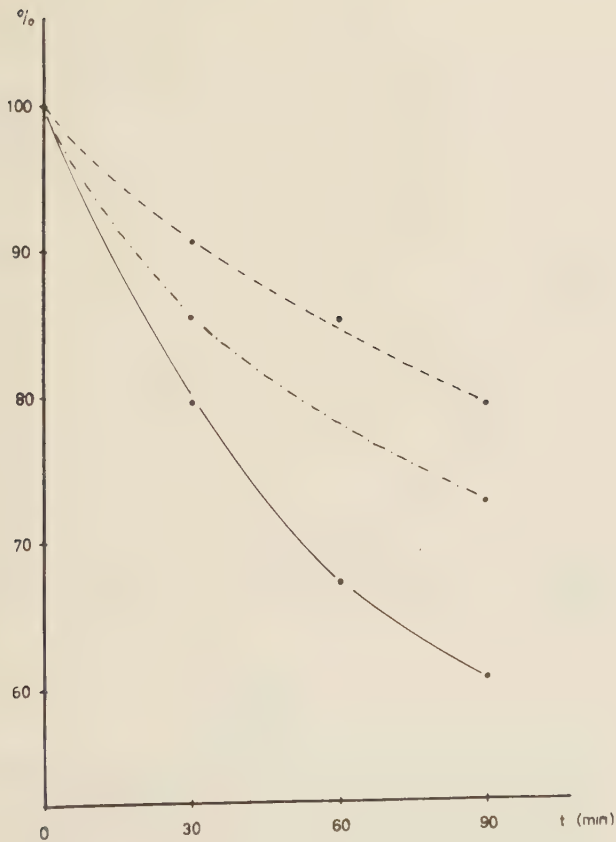


Abb. 9: Abnahme der Permeationsgeschwindigkeit des Thiamins in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration im Suspensionsmedium.

———— 72 x 10⁻¹⁰ mol pro ml Überstand als Ausgangskonzentr.
-.-.-. 414 x 10⁻¹⁰ mol pro ml Überstand als Ausgangskonzentr.
----- 883 x 10⁻¹⁰ mol pro ml Überstand als Ausgangskonzentr.

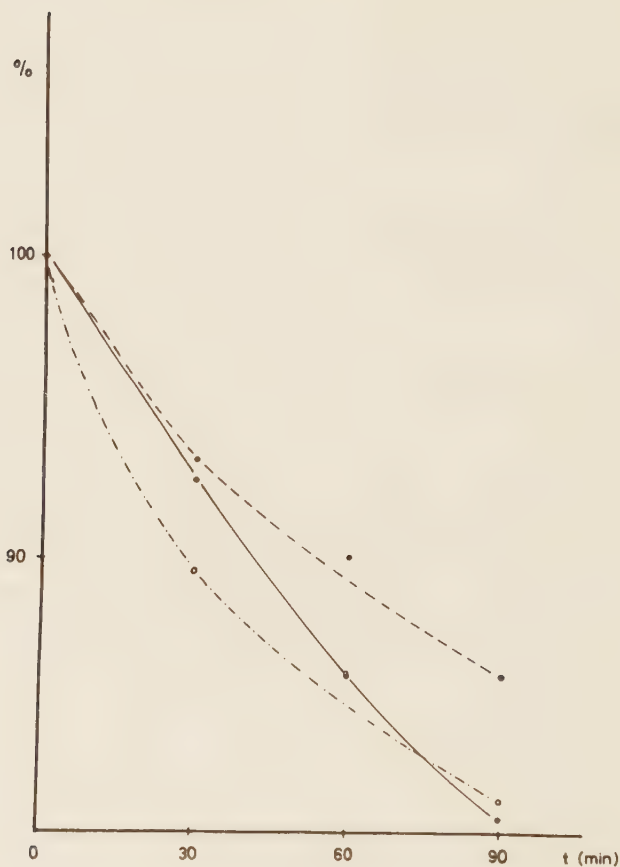


Abb. 10: Abnahme der Permeationsgeschwindigkeit von TPP in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration im Suspensionsmedium.

- 60 x 10⁻¹⁰ mol pro ml Überstand als Ausgangskonzentr.
- .-.-. 449 x 10⁻¹⁰ mol pro ml Überstand als Ausgangskonzentr.
- 843 x 10⁻¹⁰ mol pro ml Überstand als Ausgangskonzentr.

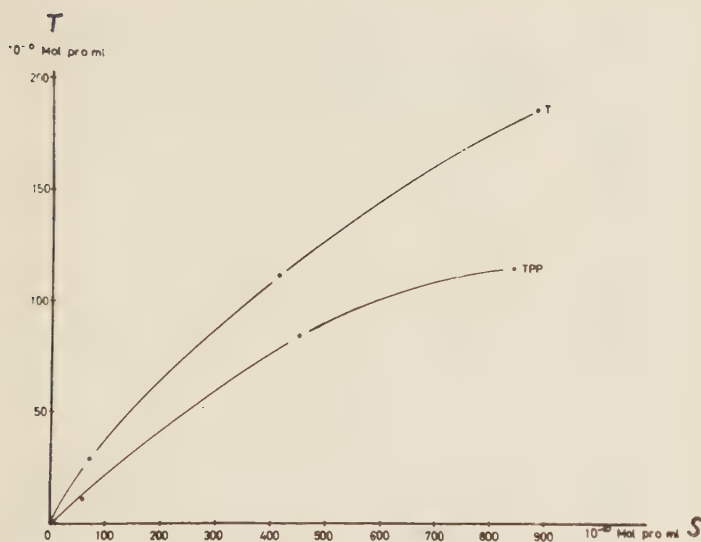


Abb. 11:

Abnahme des Thiamins und Thiaminpyrophosphats aus dem Überstand einer 25%igen Erythrozyten-suspension in Abhängigkeit von der Ausgangs-konzentration. Inkubationszeit 90 Minuten.

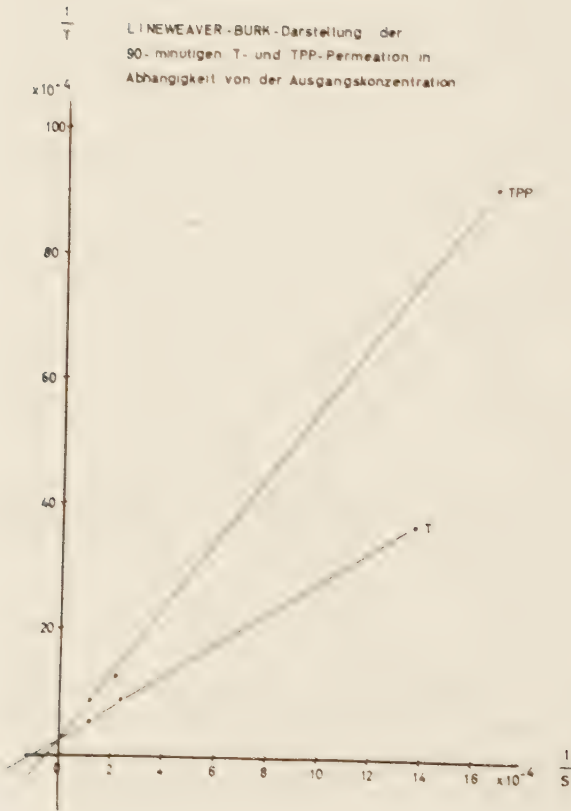


Abb. 12:

S = Ausgangskonzentration an Thiamin bzw. TPP
 T = in 90 Minuten aus 1,0 ml Suspensionsmedium
 verschwundene Menge Thiamin bzw. TPP.

Fluoreszenzwerte des TPP

N	0 Minuten	90 Minuten
I	2,36	2,44
II	2,70	2,68
III	2,74	2,85
IV	2,27	2,42

Fluoreszenzwerte des Thiamins

N	0 Minuten	90 Minuten	L
I	0,829	0,864	0,763
II	0,655	0,660	0,650
III	0,716	0,693	0,668
IV	0,567	0,556	0,534

L: Fluoreszenzwert von 1,0 ml Serum ohne TPP

Tabelle 2:

Inkubation von menschlichem Serum mit TPP⁺

⁺ 5×10^{-8} Mol pro ml Meßansatz

Fluoreszenzwerte des Thiamins

N	0 Minuten	90 Minuten
I	0,900	0,945
II	0,911	0,960
III	0,898	0,915
IV	0,863	0,889
Überstand ohne TPP	0,940	0,958
Überstand + 1×10^{-5} m Thiamin	20,235	

Tabelle 3:

Inkubation einer 25%igen Erythrozyten-
suspension mit TPP +

+ 5×10^{-8} Mol pro ml Überstand

Diskussion.

Untersuchungen mit Erythrozytensuspensionen von Thiamin-Mangeltieren zeigen, daß es nach einer "in vitro"-Inkubation der roten Blutzellen dieser Tiere mit Glucose, infolge der fehlenden Transketolaseaktivität, zu einer Anhäufung von Pentosen kommt. Diese tritt nicht auf, wenn Thiamin bzw. TPP im Suspensionsmedium vorhanden sind. Sowohl Thiamin als auch TPP stellen die Aktivität der Transketolase bei Thiamin-Mangeltieren wieder her; sie müssen also in den Erythrozyten gelangt sein.

Unter dieser Voraussetzung wurden Erythrozytensuspensionen mit Thiamin bzw. TPP inkubiert. Die Abnahme des Thiamins und Thiaminpyrophosphates ist auf die in der Suspension vorhandenen Erythrozyten zu beziehen, da bei den Versuchen lediglich Ringerphosphatpuffer verwendet wurde. Bei der Thiamin- und der TPP-Permeation fällt auf, daß mit steigender Konzentration der Verbindung im Suspensionsmedium und zunehmender Inkubationsdauer die Permeationsgeschwindigkeit abnimmt und nach 90 Minuten beinahe zum Stillstand kommt. Die Unterschiede sind beim Thiamin stärker als beim TPP, und innerhalb des gleichen Zeitraumes wird TPP in einem weit geringeren Maße von den Zellen aufgenommen als das Thiamin. Es erhebt sich die Frage, ob das TPP als phosphorylierte Verbindung überhaupt in die Zelle permeiert. Es wäre denkbar, daß TPP an der Oberfläche der roten Blutzelle oder aber im Plasma durch eine TPPase in Thiamin und Pyrophosphat gespalten wird, um dann als Thiamin die Zellmembran zu permeieren. In einem gewissen Umfang müßte dabei freies Thiamin in den Suspensionsmedien auftreten. Bei der Inkubation von Erythrozytensuspensionen mit TPP und Plasma mit TPP war kein freies Thiamin im Suspensionsmedium bzw. Plasma nachweisbar.

Wenn in einer weiteren Betrachtung das Thiamin bzw. das TPP dem Substrat entsprechen und der Erythrozyt mit seiner Oberfläche dem Enzym gleichgesetzt wird, so ergibt eine Auswertung der 90-minütigen Thiamin- und TPP-Permeationen in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration nach LINEWEAVER-

BURK, daß Thiamin und TPP eine gleiche Affinität zu der Oberfläche der roten Blutzelle aufweisen. Der unterschiedliche Umfang der Permeation in der gleichen Zeiteinheit könnte dann in einer verschiedenen Permeationsgeschwindigkeit der betreffenden Verbindung durch die Erythrozytenmembran seine Erklärung finden. Es muß dann angenommen werden, daß das Thiamin schneller in den Erythrozyten permeiert als das TPP, bei gleicher Affinität beider Verbindungen zu der Zelloberfläche.

Die Klärung der Frage, ob es zu einer Aufnahme von Thiamin bzw. TPP in die Zellen oder nur zu einer Adsorption an die Zelloberfläche kommt, konnte nur im biologischen Test beantwortet werden. Ein direkter Beweis läßt sich methodisch schwer erbringen, da bei der Isolierung der Erythrozyten noch Reste des verbliebenen Suspensionsmediums an der Oberfläche der Zellen haften, die eine Waschung notwendig machen. Werden aber die roten Blutkörperchen gewaschen, so wird entweder die adsorbierte Substanz von der Zelloberfläche abgelöst oder die permeierte Substanz dringt mit Änderung des Konzentrationsgefälles in die Waschflüssigkeit.

Bei den anfangs aufgeführten Wirkungen des Thiamins im biologischen Test muß dieses nach seiner Permeation in die rote Blutzelle durch eine Pyrophosphokinase phosphoryliert worden sein, um als Coenzym des Fermentes Transketolase eine biologische Aktivität aufzuweisen. Das Vorkommen eines solchen phosphorylierenden Enzyms, der sogenannten Thiaminpyrophosphokinase, in anderen Geweben wurde mehrfach beschrieben (35). Ob es sich bei der in dieser Arbeit mitgeteilten Beobachtung um den Effekt eines spezifischen Enzyms handelt oder ob die Phosphorylierung auf Grund einer unspezifischen Reaktion erfolgt, muß vorerst dahingestellt bleiben.

Zur Wiederherstellung der Transketolaseaktivität im biologischen Test muß TPP in die Zelle permeieren. Ob es unverändert die Erythrozytenmembran passiert oder ob vor oder während der Permeation eine Abspaltung von Thiamin erfolgt, das dann in-

trazellulär wieder zu TPP phosphoryliert wird, konnte in dieser Arbeit nicht endgültig geklärt werden.

Zusammenfassung.

1. Rattenerythrozyten sind in der Lage, Thiamin zu Thiaminpyrophosphat zu phosphorylieren, wie aus der Wiederherstellung der Transketolaseaktivität in roten Blutzellen von Thiaminmangeltieren hervorgeht.
2. Thiamin und Thiaminpyrophosphat permeieren durch die Erythrozytenmembran.
3. Thiamin und Thiaminpyrophosphat weisen eine gleiche Affinität zu der Zelloberfläche der roten Blutkörperchen auf, wobei die Permeationsgeschwindigkeit des Thiamins wahrscheinlich größer ist als die des Thiaminpyrophosphates.

Literatur

- (1) ABABEI, L.: Der Stoffwechsel des Glutamins in Retikulo-
zyten. *Folia haemat.* 78, 568-571 (1962).
- (2) BARBERA, G.: The use of cocarboxylase in Diabetes mellitus.
Rif. med. 67, 12, 324-329 (1953).
- (3) BARTOUSEK, V. und B. DEBANSKY: Erfahrungen mit Cocarboxy-
lase bei multipler Sklerose und einigen anderen Nerven-
erkrankungen. *Med. Mschr.* 11, 12, 800-805 (1957).
- (4) BENDA, L.: Die Bedeutung des Myokardstoffwechsels für die
Therapie der Herzkrankheiten. *Prakt. Arzt* 2, 50-66
(1966).
- (5) BENDA, L., D. DONEFF und K. MOSER: Klinische und experimen-
telle Untersuchungen über die Wirkung der Cocarboxy-
lase bei Herzerkrankungen. *Med. Klin.* 18-29, 775-778
(1960).
- (6) BENDA, L., D. DONEFF und K. MOSER: Die Wirkung der Cocar-
boxylase bei Adams-Stokes-Anfällen und AV-Block. *Wien.*
med. Wschr. 9, 75-77 (1961).
- (7) BENESCH, R.E., and R. BENESCH: Relation between erythrocyte
integrity and sulfhydryl groupes. *Arch. Biochem.* 48,
38-42 (1954).
- (8) BEUTLER, E., and M.K.Y. YEH: Erythrocyte glutathione reduct-
ase. *Blood* 21, 573-585 (1963).
- (9) BLUM, K.U.: Der Stoffwechsel menschlicher Erythrozyten.
Z. Blutforsch. 11, 90-101 (1965).
- (10) BLUM, K.U.: Stoffwechselveränderungen bei Lagerung von Blut.
Bibl. haemat. 12, 20-63 (1961).
- (11) BRIN, M.: Erythrocyte transketolase in early thiamine defi-
ciency. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 98, 2, 528-541 (1962).
- (12) BRIN, M., and R.H. YONEMOTO: Stimulation of the glucose oxi-
dative pathway in human erythrocytes by methylene blue.
J. biol. Chem. 230, 307-317 (1958).

- 13) BROUWER, K.: Diabetes en extreme resistentie tegen insuline. Ned. T. Geneesk. 22, 1045-1052 (1957).
- 14) BURCH, H.B., O.A. BESSEY, R.H. LOVE, and H.O. LOWRY: The determination of thiamine and thiamine phosphates in small quantities of blood and blood cells. J. biol. Chem. 198, 447 (1952).
- 15) CARLSSON: Lehrbuch der Biochemie. p. 240. Thieme-Verlag, Stuttgart 1964.
- 16) DUSCHL, H.: Über die unterstützende Behandlung der Intoxikation mit Cocarboxylase. Mschr. Kinderheilk. 103, 236-238 (1955).
- 17) FOULKES, E.C., and R. LEMBERG: Ser. B. 136, 435 (zit. nach 41) (1949).
- 18) GASSMANN, W.: Zur Diagnose und Therapie des Koma diabeticum. Medizinische 22, 827-829 (1956).
- 19) GRÄFE, H.: Therapie des diabetischen und hypoglykämischen Komas. Therapiewoche 5, 207-210 (1955).
- 20) GROS, H., E.J. KIRNBERGER und K.H. SCHIFFER: Zur Frage der Stoffwechselstörung bei Multipler Sklerose. Med. Wschr. 97, 130-132 (1955).
- 21) HAUGEN, H.N.: Thiaminundersøkelser. Universitetsforlaget 1965.
- 22) HEIMANN-HOLLAENDER, E., J. BENBASSAT, and J.J. GROEN: Glucose metabolism, glutathion stability and electrolyte composition of human red cells.
- 23) HENNESSY, D.J., and L.R. CERECEDO: The determination of free and phosphorylated thiamine by a modified thiochrome assay. J. amer. chem. Soc. 61, 179 (1939).
- 23a) HERBAIN, M.: Bull. Soc. Chim. biol. 32, 784 (1950).
- 24) HOFMANN, E.C.G., H.v. KREPL und R. PESCHKE: Der Stoffwechsel von Monosacchariden im roten Blutkörperchen.
- 25) HOHORST, H.J.: Die Bedeutung der Milchsäurebestimmung für Forschung und Klinische Medizin. Therap. Monat, Mannheim 2, 54 (1957).

- (26) HOYER, H.: Über die ambulante Behandlung der relativen Herzinsuffizienz mit Strophil und Berolase. *Med. Mschr.* 4, 253-245 (1958).
- (27) JENSEN, B.C.P.: Quantitative Bestimmung der B₁-Vitamine. *Z. Vitaminforsch.* 7, 239 (1938).
- (28) KOCH, R.: Zur Frage der Beeinflussung extrainsulärer Einflüsse beim kindlichen Diabetes. *Med. Klin.* 45, 1489-1491 (1952).
- (29) LASCH, F.: Brenztraubensäure und Cocarboxylase. Über die Bedeutung der Brenztraubensäurebestimmung im Blute für die klinische Diagnostik und die therapeutische Beeinflussung des erhöhten Brenztraubensäurespiegels durch Cocarboxylase. *Dtsch. med. Wschr.* 78, 27/28 (1953).
- (30) LASCH, F.: Über die Behandlung der schweren toxischen Diphtherie mit Cocarboxylase. *Ann. pediat.* 178, 333-340 (1952).
- (31) LAWRENZ, K.H.: Klinische Erfahrungen mit Cocarboxylase bei Säuglingstoxikosen. *Kinderärztliche Praxis* 11, 547-551 (1959).
- (32) LEUBE, H.: Therapeutische Erfahrungen mit Cocarboxylase bei Multipler Sklerose. *Medizinische Z.* 961-962 (1954).
- (33) MARKUS, S. und F.W. MEYER: Die Therapie des Coma diabeticum mit Cocarboxylase. *Schweiz. med. Wschr.* 39, 931-936 (1949).
- (34) LEUTHARDT, F.: Lehrbuch der Physiologischen Chemie. 15. Aufl. 1963. Walter de Gruyter u. Co.
- (35) LEUTHARDT, F. und H. NIELSEN: Phosphorylation biologique de la thiamine. *Helvet. chim. Acta* 35, 1196 (1952).
- (36) LINEWEAVER, H. und D. BURK: Biochemisches Taschenbuch, 694-707 (zit. nach H.M. ROUEN). Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956.
- (37) MARKUS, S.: Über die Regulation der Brenztraubensäure. *Z. klin. Med.* 145, 354-364 (1949).
- (38) MEYERBAUM, W.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 258, 117 (1939).

- (39) MICHEL, D. und O. HARTLEB: Zur Steigerung der Strophantin-wirkung der Cocarboxylase. Z. Kreisforsch. 48, 557-570 (1959).
- (40) MILLS, G.C., and H.P. RANDALL: The protection of hemoglobin from oxidative breakdown in the intact erythrocyte. J. biol. Chem. 232, 589-598 (1958).
- (41) MILLS, G.C.: Haemoglobin catabolism. Glutathion peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J. biol. Chem. 229, 189-197 (1957).
- (42) MOHR, W. und C. ROTH: Die Bedeutung der B-Vitamine für die Tropenmedizin. B-Vitamine, Klinische und physiologisch-chemische Probleme. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart 1965.
- (43) ORLOFF, W.: Biochemische Untersuchungen zur Wirkung der Co-carboxylase bei frischen Herzinfarkten. Ärztl. Wschr. 6, 98-100 (1960).
- (44) FRANKERD, T.A.J.: The red cell. p. 71. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1960.
- (45) REINAUER, H., F.H. BRUNS: Limitierende Faktoren der Glykolyse in roten Blutzellen des Menschen. Biochem. Z. 340, 503-521 (1964).
- (46) ROSE, J.A., and E.L. CONNELL: The role of glucose-6-phosphate in the regulation of glucose metabolism in human erythrocytes. J. biol. Chem. 239, 12-17 (1964).
- (47) SCHMIDT, K.D. und O. STRAHLER: Zur Anfangsbehandlung des Coma diabeticum mit hohen Insulindosen. Medizinische 7, 289-291 (1959).
- (48) STEIGERWALDT, F.: Das Diabetische Koma. Med. Mschr. 12, 145-146 (1958).
- (49) STROHECKER, R. und H.M. HENNING: Vitaminbestimmungen p. 68-74, 75-79, 79-83. Verlag Chemie GmbH 1963.
- (50) TORRE DELLA, L., G. TECCE und A. BALDANTONI: Der Gehalt an BTS im Blut bei Herzdekompensation und die Wirkung der Cocarboxylase.

- (51) WEISER, H.: Resorption von Thiamin und Thiaminderivaten. B-Vitamine, Klinische und physiologisch-chemische Probleme. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart 1965.
- (52) WESTENBRINK, H.G.K., and J. GOUDSMIT: The determination of aneurin in urine by the thiochrome reaction. Rec. d. trav. chim. d. Pays-Bas 56, 803 (1937).
- (53) GRIGNANI, F. u. G.W. LÖHR: Über die Hexokinase in menschlichen Blutzellen. Klin. Wschr. 38, 796-799 (1960).

Lebenslauf

Am 26. Juli 1941 wurde ich, Lothar Thomas, als Sohn des Drehers Jakob Thomas und seiner Frau Else geb. Hildebrandt in Oberkaufungen in Hessen geboren.

Im Jahre 1948 wurde ich in die Volksschule in Oberkaufungen eingeschult, die ich bis 1953 besuchte. Anschließend wechselte ich auf die Freiherr-vom-Stein-Schule in Hessisch Lichtenau über, wo ich bis zur mittleren Reife blieb. Ab 1959 besuchte ich die Goetheschule in Kassel und bestand dort im März 1962 das Abitur.

Im Sommersemester des gleichen Jahres begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Medizinstudium und legte dort im Oktober 1964 die ärztliche Vorprüfung ab. Mit Beginn des Wintersemesters 1965/66 nahm ich im Stoffwechsellabor der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin die Arbeit zum praktischen Teil meiner Dissertation auf, die ich in 20 Monaten ausgeführt habe. Am 23. März 1968 bestand ich die Ärztliche Prüfung an der Freien Universität Berlin.

